

# Determination of steroid hormones in wild bighorn sheep feces cimarrón (*Ovis canadensis* Shaw) in Baja California Mexico

## Determinación de hormonas esteroides en heces de borrego cimarrón (*Ovis canadensis* Shaw) silvestres en Baja California, México

Escobar-Flores, Jonathan G.<sup>1\*</sup>, Salame-Méndez, Arturo<sup>2</sup>, Sandoval, Sarahi<sup>3</sup>, Martínez-Gallardo, Roberto<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, Durango, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa Departamento de Biología de la Reproducción, México. <sup>3</sup>CONACyT-Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR, Unidad Durango, Durango, México. <sup>4</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias, Campus Ensenada, Ensenada, Baja California, México.

\*Autor para correspondencia: escobarf@ipn.mx

### ABSTRACT

**Objective:** Determine steroid hormones in wild bighorn sheep feces cimarrón (*Ovis canadensis*) using a non-invasive method.

**Design/methodology/approach:** Progestogens, androgens and estradiol were measured in the feces of wild bighorn sheep living in the Sierra San Felipe mountains in Baja California in the winter, spring and summer of 2007. The steroids were quantified by immunoassay, carried out in a microtiter plate.

**Results:** The hormonal profile showed that 96 samples were feces from males and 65 from females. The concentration of progestogens in feces of females varied by season, with the highest concentrations in spring (280 ng/g). The concentrations of progestogens and estrogens in females increased as environmental conditions improved from winter to spring, coinciding with the increase in androgens in males, which averaged 23.78 ng/g.

**Limitations/implications of the study:** With this method it was not possible to identify the sex of samples from juvenile individuals. It is recommended that fresh stool samples be analyzed in order to relate hormone concentrations to seasonal reproductive events.

**Findings/conclusions:** The springtime increase in progestogen and estrogen concentrations in the feces of females and of androgens in males suggests the initiation of reproductive activity. The concentrations of these hormones in both sexes during the summer are very low (<5 ng/g), which suggests low reproductive activity.

**Keywords:** hormonal profile, enzyme immunoassay, *Ovis canadensis*, reproduction.



## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar hormonas esteroides en heces de borrego cimarrón silvestre cimarrón (*Ovis canadensis*) mediante un método no invasivo.

**Diseño/metodología/enfoque:** En este estudio se evaluaron progestágenos, andrógenos y estradiol en heces de borrego cimarrón silvestres que habitan en la Sierra San Felipe en Baja California, durante la primavera, invierno y verano del año 2007. Los esteroides se cuantificaron mediante inmuno ensayo enzimático y la cuantificación se realizó en una placa de micro titulación.

**Resultados:** Con el perfil hormonal se identificó que 96 eran heces provenientes de machos y 65 de hembras. La concentración de progestágenos en las heces de hembras varió entre las estaciones del año, registrándose en primavera la concentración más alta (280 ng/g). Las concentraciones de progestágenos y estrógenos en las hembras aumentaron a medida que las condiciones ambientales mejoraron desde el invierno hasta la primavera, coincidiendo con el aumento de andrógenos en los machos a una concentración promedio de 23.78 ng/g.

**Limitaciones en el estudio/implicaciones:** Con este método no fue posible asignar el sexo de las muestras provenientes de individuos juveniles. Se recomienda analizar muestras de heces frescas para relacionar las concentraciones de hormonas con eventos reproductivos estacionales.

**Hallazgos/conclusiones:** El aumento de las concentraciones de progestágenos y estrógenos en las heces de las hembras y los andrógenos en los machos en la primavera sugiere el inicio de la actividad reproductiva. Las concentraciones de estas hormonas en ambos sexos durante el verano son muy bajas (<5 ng/g), lo que sugiere actividad reproductiva baja.

**Palabras clave:** ensayo inmunoenzimático, *Ovis canadensis*, perfil hormonal, reproducción.

malmente es precedido por combates o conductas pre-cortejo (McElliott et al., 2001).

Los borregos cimarrones tienen un sistema de reproducción de tipo poliginico, un alto dimorfismo sexual, normalmente están segregados sexualmente, con excepción de la época de cortejo o ruta. Estos comportamientos, que se relacionan con su distribución espacio-temporal, pueden ser explicados mediante el análisis hormonal y relacionarlo con las conductas de los borregos cimarrones observadas en campo (Martínez y Ayala, 2007).

Sin embargo, pocos trabajos de aspectos reproductivos por métodos indirectos se han realizado con el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) en vida libre, por lo que el objetivo de esta investigación fue cuantificar andrógenos, progestágenos y estradiol contenidos en heces fecales, para posteriormente realizar un sexado de las muestras y comparar los perfiles hormonales de machos y hembras con la temporalidad del año.

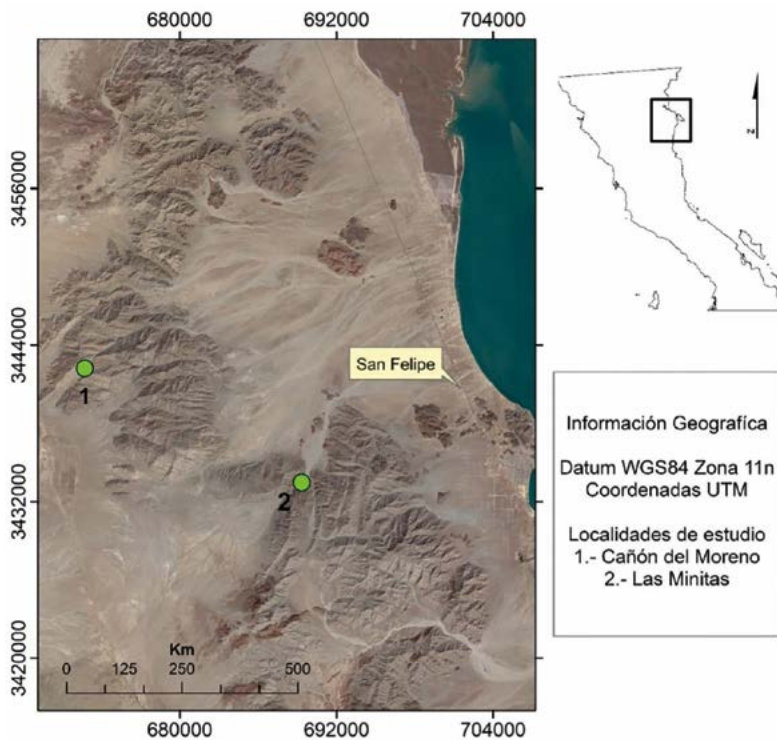
## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Sierra San Felipe, la cual se localiza dentro de la ecorregión desierto del Alto Golfo en Baja California (Figura 1). El clima es seco con lluvias en verano e invierno. Las temperaturas máximas se registran en el verano y llegan a alcanzar los 50 °C (SMN, 2010). La vegetación en la sierra es matorral xerófilo y las especies dominantes son: *Ambrosia dumosa*, *Ditaxis lanciolata*, *Fouquieria splendens*, *Yucca shidigera*, *Pachycereus pringlei*, *Encelia farinosa*, *Cercidium microphyllum*, *Psoralea spinosa* (Delgadillo, 1998).

## INTRODUCCIÓN

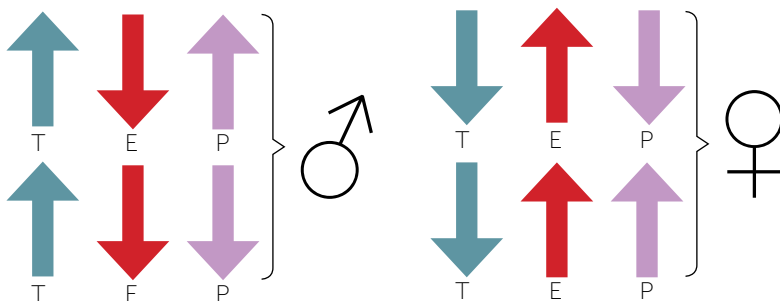
El análisis de hormonas esteroides sexuales en heces fecales es una herramienta útil para la determinación del sexo en especies que no presentan dimorfismo sexual y donde el estudio de la fisiología reproductiva no requiere un contacto directo con el organismo (Soto et al., 2004). La relevancia de este método "no invasivo", incide en la nula manipulación del individuo, evitando así algún estrés provocado por el incremento de niveles de glucocorticoides (Schwarzenberger, 2007). El conocimiento de los niveles hormonales en animales silvestres ayuda a conocer los factores que determinan la organización social y los sistemas de apareamiento (Schakleton, 1991).

Los ungulados silvestres son buenos modelos de estudio por su longevidad y su amplia variedad de sistemas de reproducción, lo cual permiten explicar cómo la variación hormonal puede afectar sus comportamientos, donde el acceso a hembras receptivas es determinado por un estatus social, que nor-



**Figura 1.** Localidades de estudio en la Sierra San Felipe, Baja California, México.

Se seleccionaron dos sitios de estudio, Cañón El Moreno y Las Minitas, que se caracterizan por tener los registros más numerosos de borregos cimarrones para la Sierra San Felipe (Lee et al., 2012) (Figura 1). Para la colecta de las muestras fecales se realizaron recorridos a pie en tres estaciones del año: primavera, verano e invierno del año 2007 para las dos localidades. Los recorridos consistieron en una búsqueda exhaustiva de heces fecales de borrego cimarrón, comenzando de las partes más bajas de la sierra en los 500 m y terminando en los 1,200 m. De cada muestra localizada se estimó la antigüedad por su color y consistencia; heces con color café oscuro y consistencia blanda se consideraban recientes (menor a un mes) y se colectaban en una bolsa de papel estraza para su transporte al laboratorio. Cada muestra fue georeferenciada con un GPS Garmin y Datum WGS84.



**Figura 2.** Las flechas hacia abajo indican una menor concentración y las flechas hacia arriba lo contrario. Testosterona (T), Estradiol (E2), Progesterona (P4).

## Cuantificación de hormonas esteroides

Se realizó la extracción total de esteroides (ETE), progestágenos (progesterona-P4), estrógenos (estradiol-E2) y andrógenos (testosterona-T) con éter dietílico. Posteriormente se cuantificaron dichos esteroides con la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA), utilizando kits de Diagnostic, Inc<sup>®</sup>, Webster, Texas. Se determinó la concentración de cada hormona en un espectrofotocolorímetro (Microplate Reader, MR 600, Dynatech Product<sup>®</sup>).

Con los resultados de las concentraciones se determinó el sexo de cada muestra, a partir de la relación diferencial entre las hormonas esteroides sexuales (HES); la premisa antes mencionada se basa en la hipótesis hormonal de la diferenciación sexual, es decir, en los machos hay mayor producción de andrógenos —testosterona—, que de estrógenos —estradiol—, mientras que en las hembras es lo contrario (Bishop y Hall, 1991; Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, 1998) (Figura 2). Para determinar si hay diferencias significativas entre la concentración de HES y la estación del año, se realizó un análisis de varianza de una vía en el programa R Statistics.

Se realizaron los análisis de varianza de una vía en el programa R Statistics.

## RESULTADOS

Un total de 196 muestras fueron recolectadas. Se encontró que 96 correspondían a machos, 65 a hembras, y 35 no presentaron una diferenciación de concentraciones de andrógenos y estrógenos, por tanto, no se les asignó sexo y todas estas heces tuvieron un tamaño pequeño (volumen  $<0.7621 \text{ cm}^3$ ), posiblemente estas heces corresponden a corderos.

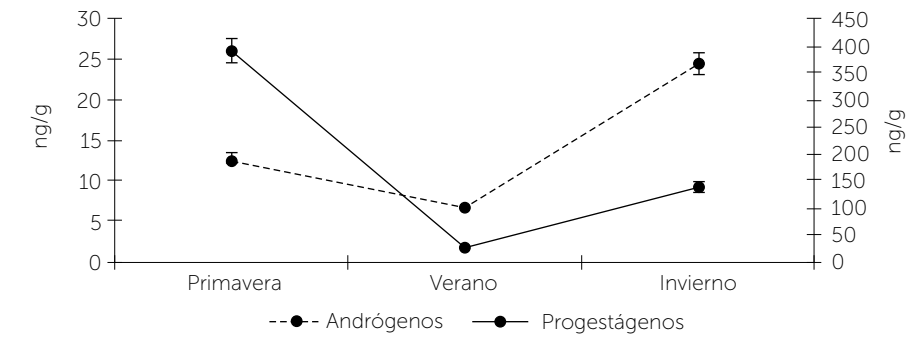
Los resultados del ANOVA, en las muestras identificadas como machos, muestran que la concentración de andrógenos fue diferente estadísticamente entre las estaciones del año ( $F=12.60$ ,  $p<0.05$ ), encontrando un aumento de andrógenos paulatinamente a través de las estaciones. En verano se registraron las menores concentraciones promedio (5.84 ng/g), seguidas de las muestras de primavera (12.68 ng/g), y la mayor concentración se tuvo durante el invierno (23.78 ng/g). La concentración de progestágenos siguió una tendencia similar, en otoño se obtuvo la menor concentración (29.36 ng/g), en primavera la mayor concentración (316.30 ng/g) que se

redujo durante el invierno (130.39 ng/g) (Figura 3).

En las muestras identificadas como de hembras, las concentraciones de progestágenos variaron significativamente entre las estaciones del año ( $F=38.1$ ,  $p<0.05$ ), las concentraciones más bajas de progestágenos fueron en el verano (37.16 ng/g) y la mayor concentración fue en la primavera (276.96 ng/r). Respecto a la concentración de estrógenos, no se encontraron diferencias significativas entre las estaciones del año ( $F=2.98$ ,  $p>0.05$ ); con concentraciones bajas en el verano (0.14 ng/g) y altas en el invierno (1.59 ng/g) (Figura 4).

### DISCUSIÓN

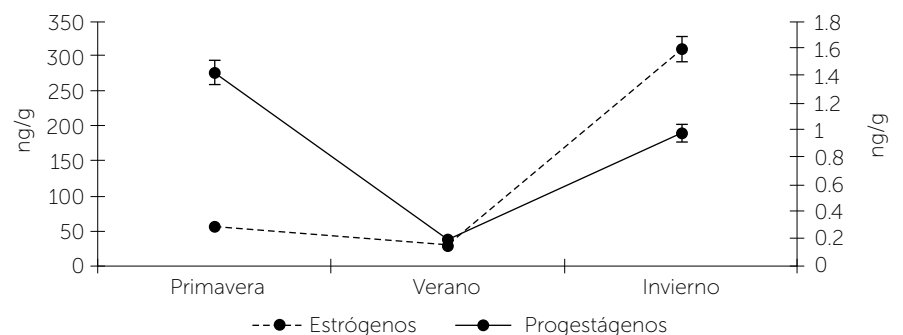
Los resultados de esta investigación indican que la comparación diferencial de HES (andrógenos, progestágenos y estrógenos), es útil para asignar el sexo en muestras fecales de género desconocido, como fue el caso del borrego cimarrón. Sin embargo, este método puede ser cuestionado, ya que la concentración de dichas hormonas está en función de las condiciones ambientales y el alimento que consumen los organismos, lo cual puede incurrir en errores de interpretación cuando se asigna el sexo principalmente en corderos y añeros, individuos que están en desarrollo y no es claro asignar un sexo (Soto-Mendoza, 2006; Valdespino *et al.*, 2007). La concentración de HES siguió un patrón estacional en ambos sexos, en el verano la concentración hormonal fue baja (Figuras 3 y 4), lo cual posiblemente esté relacionado con las condiciones de estiaje y por tanto la actividad reproductiva puede estar en latencia. Resultados similares reportaron Rubin *et al.* (2000) para poblaciones de borregos cimarrones en los desiertos de California. Se sabe que en mamíferos poligínicos, los niveles de testosterona están correlacionados con el desarrollo de masa muscular y esquelética, y comportamientos agresivos previo al cortejo (Sapolsky, 1993). En el borrego cimarrón se ha documentado que los niveles de testosterona tienen un patrón estacional relacionado con el establecimiento de la estructura social previo al período de apareamiento (Geist, 1971). Por ejemplo, Pelletier *et al.* (2003) reportaron que durante el otoño, los niveles de testosterona en borregos cimarrones machos que habitan en Alberta, Canadá son más altos (60 ng/g), y se relacionó con un aumento de conductas agresivas de los machos previo al apareamiento. Los hallazgos de este estudio indicarían que es durante el invierno cuando los niveles de testosterona son más altos y por lo que se esperarían conductas precortejo durante esta estación (Figura 5).



**Figura 3.** Resultados de las concentraciones de HES en heces identificadas como provenientes de machos de borrego cimarrón de sierra San Felipe, Baja California.

Las concentraciones de estradiol y progesterona encontradas en hembras sugieren que los eventos de apareamiento, gestación y lactancia ocurrirán entre el invierno y la primavera. Lo anterior se corroboró con la observación de grupos de hembras con añeros (Figura 6), resultados que también obtuvieron Borjesson *et al.* (1996) y Schoenecker *et al.* (2004), en borregos cimarrones silvestres.

También se observó un aumento similar de las concentraciones de progesterona y estrógenos en la estación de invierno, lo cual es importante en los borregos silvestres para la expresión de conductas de estro (Soto, 2006). Durante el verano se encontró que la producción de las HES es muy baja, principalmente estradiol con concentraciones menores a 0.1 ng/g, las cuales son



**Figura 4.** Resultados de las concentraciones de HES en heces identificadas como provenientes de hembras de borrego cimarrón de sierra San Felipe, Baja California.



**Figura 5.** Machos adultos realizando conductas de Flehmen que indica la detección de hembras receptivas en el sitio (Fotografía: Jonathan Escobar-Flores).

similares a las encontradas por Soto (2006), en borregos cimarrones en cautiverio y concluye que las hembras se encuentran en anestro.

## CONCLUSIONES

El monitoreo "no invasivo", por medio de la cuantificación de hormonas sexuales a partir de heces es útil para identificar los eventos reproductivos en el borrego cimarrón, a un menor costo que los métodos de manipulación directa. Sin embargo, no se recomienda para determinar el sexo en organismos menores a un año, ya que no es clara la diferenciación entre andrógenos y estrógenos. Los resultados de este trabajo representan un acercamiento en la fisiología reproductiva del borrego cimarrón que se distribuye en vida libre, y su potencial uso se relaciona con la ubicación de sitios de nacimientos y crianza, que son vitales para la conservación de esta especie. Se recomienda el uso de este método en sitios donde es difícil la observación de borregos cimarrones y se desconocen sus eventos reproductivos.

## LITERATURA CITADA

- Bishop, C.M. & Hall, M.R. (1991). Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. *Journal of Zoology*, 224(4), 649-688. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb03793.x>
- Borjesson, D.L., Boyce, W.M., Gardner, I. A., De Forge, J. & Lasley, B. (1996). Pregnancy detection in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using Fecal-based enzyme immunoassay. *Journal of Wildlife Diseases*, 32, 67-74.
- Delgadillo, J. (1998). *Florística y Ecología del Norte de Baja California, México*. 2da. Edición. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, B.C., México. 413 pp.



**Figura 6.** Rebaño de hembras con corderos y añeros durante la estación de invierno (Fotografía: Jonathan Escobar-Flores).

- Geist, V. (1971). *Mountain sheep: a study in behavior and evolution*. The University of Chicago Press, Chicago Illinois.
- Lee, R., Martínez, G.R., Zatarain, J. & Escobar, F.J.G. (2012). Observations of distribution and abundance of bighorn sheep in Baja California, México. *California Fish and Game*, 98(1), 51-59.
- Martínez, G. R. & Ayala, C.S. (2007). *Biología, Hábitat y manejo del borrego cimarrón (Ovis canadensis) en México* (pp.151-163). Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Mcelligott, A.G., Gammell, M.P., Harty, H.C., Paini, D.R., Murphy, D.T., Walsh, J.T. & Hayden, T.J. (2001). Sexual size dimorphism in fallow deer (*Dama dama*): do larger, heavier males gain greater mating success? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(4), 266-272.
- Pelletier, F., Bauman, J. & Festa-Bianchet, M. (2003). Fecal testosterone in big horn sheep (*Ovis canadensis*): behavioural and endocrine correlates. *Canadian Journal of Zoology*, 81(10), 1678-1684. <https://doi.org/10.1139/z03-156>
- Rubin, E.S., Boyce, W.M. & Bleich, V.C. (2000). Reproductive strategies of desert bighorn sheep. *Journal of Mammalogy*, 81(3), 769-786. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2000\)081<0769:RSO DBS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2000)081<0769:RSO DBS>2.3.CO;2)
- Salame-Méndez, A. & Villalpando-Fierro I. (1998). La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. *Acta Zoologica Mexicana*, 73, 89-110.
- Sapolsky, R.M. (1993). The physiology of dominance in stable versus unstable social hierarchies. En W.A. Mason, S.P. Mendoza. (Eds). *Primate Social Conflict* (pp. 171-204). New York: State University of New York Press.
- Schakleton, D.M. (1991). Social maturation and productivity in bighorn sheep: are young males incompetent? *Applied Animal Behaviour Science*, 29(1-4), 173-184. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90245-5](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90245-5)
- Schoenecker, K. A., Lynda R.O. & Kirkpatrick, J. (2004). Comparison of three fecal metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Journal of Wildlife Disease*, 40(2), 281-473. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.273>

- Schwarzenberger, F. (2007). The many uses of non-invasive fecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, 41(1), 52-74. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00017.x>
- Servicio Meteorológico Nacional. (2010). Estación meteorología de San Felipe. Fecha de acceso febrero del 2010.
- Soto-Mendoza, S. (2006). Monitoreo no invasivo de las etapas reproductivas en borregas cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) en cautiverio mediante la observación conductual reproductiva y la cuantificación de esteroides fecales. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Maestría en ciencias de la producción y de la salud animal. México. D.F.
- Valdespino, C., Martínez-Mota, R., García-Feria, L. M., & Martínez-Romero, L. E. (2007). Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: evolución de una metodología no invasiva. *Acta zoológica mexicana*, 23(3), 151-180.

